

特公平7-121227

(24) (44)公告日 平成7年(1995)12月25日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 P 13/14	A	2121-4B		
C 12 N 15/09				
// (C 12 P 13/14	A			
C 12 R 1:15)				
		9281-4B	C 12 N 15/00	A
			発明の数1(全7頁)	最終頁に統く

(21)出願番号 特願昭61-246895
 (22)出願日 昭和61年(1986)10月17日
 (65)公開番号 特開昭63-102692
 (43)公開日 昭和63年(1988)5月7日
 微生物の受託番号 FERM BP-1160

(71)出願人 99999999
 協和醸酵工業株式会社
 東京都千代田区大手町1丁目6番1号
 (72)発明者 勝亦 賢一
 東京都町田市成瀬2-12-3 ポプラ丘コ
 ーブ6-401
 (72)発明者 横井 治彦
 東京都町田市成瀬台2-32-4 ポプラケ
 丘コープ21-205
 (72)発明者 木野 邦器
 東京都町田市旭町1-6-16

審査官 種村 繁樹

(54)【発明の名称】 L-グルタミン酸の製造法

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】微生物のホスホフルクトキナーゼの合成に関与する遺伝情報を担うDNA断片とベクターDNAとの組換え体DNAを保有するコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する微生物を培地に培養し、培養物中にL-グルタミン酸を生成蓄積させ、該培養物からL-グルタミン酸を採取することを特徴とするL-グルタミン酸の製造方法。

【請求項2】該DNA断片がエシェリヒア属、コリネバクテリウム属、プレビバクテリウム属またはバチルス属に属する微生物に由来することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の方法。

【請求項3】該ベクターがコリネバクテリウムまたはプレビバクテリウム属細菌中で自律複製できるものから選ばれる特許請求の範囲第1項記載の方法。

2

【請求項4】組換え体DNAを保有する微生物がコリネバクテリウム・グルタミクムK69 (FERM BP-1160) である特許請求の範囲第1項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

産業上の利用分野

本発明は微生物のホスホフルクトキナーゼ(以下PKFと略す)の合成に関与する遺伝情報を担うDNA断片とベクターDNAとの組換え体DNAをコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する微生物に保有させ、該微生物を培地に培養し、培養物中にL-グルタミン酸を生成蓄積させ、該培養物からL-グルタミン酸を採取することを特徴とするL-グルタミン酸の製造法に関する。したがって、本発明はバイオインダストリーの産業分野に関し、とくに食品工業において有用なL-グルタミン酸の製造分野に関する。

従来の技術

コリネバクテリウム属やプレビバクテリウム属などに属する微生物を用いる発酵法によるL-グルタミン酸の製造法については、該属菌種の野生株を用いる方法の他、野生株から誘導されたオレイン酸などに対する栄養要求性変異株（特公昭50-19632、特開昭57-102193）、リゾチーム感受性変異株（特開昭54-122794）、温度感受性変異株（特公昭58-32595）、フロロピルビン酸感受性変異株（特公昭57-21313）、あるいは種々の物質に耐性を有する変異株（特開昭50-89590、特開昭56-164792、特開昭60-66990）などを用いる方法が知られている。

一方、組換えDNA技法により育種された菌株を用いるL-グルタミン酸の製造法も知られている。例えば、ホスホエノールビルビン酸カルボキシラーゼをコードする遺伝子を含む組換え体DNAを保有する菌株を用いてL-グルタミン酸を発酵生産する方法（特開昭58-126789）などが知られている。

発明が解決しようとする問題点

食品添加物などとして有用なL-グルタミン酸は大量の需要があり、その製造法の改良は常に望まれている。

問題点を解決するための手段

解糖系に係わる諸酵素のうち、フルクトース-6-リン酸からフルクトース-1,6二リン酸への合成を触媒する酵素であるPFKは、種々の細胞内因子により活性の調節をうけるアロステリック酵素であり、解糖系全体の律速酵素であると考えられている。

本発明者はこのPFKの増幅による効果を検討したところ、微生物のPFKの合成に関与する遺伝子（以下PFK遺伝子と称すこともある）を含む組換え体DNAをL-グルタミン酸生産菌に導入すれば、より高収率でL-グルタミン酸を製造できることを見出し本発明を完成するに至った。

PFKの合成に関与する遺伝子を含む組換え体DNAがL-グルタミン酸の生産性に寄与することは、本発明者により初めて見出されたものである。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明によれば、微生物のPFKの合成に関与する遺伝情報を担うDNA断片とベクターDNAとの組換え体DNAを保有するコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する微生物を培地に培養し、培養物中にL-グルタミン酸を生成蓄積させ、該培養物からL-グルタミン酸を採取することにより、より高収率でL-グルタミン酸を製造することができる。

宿主微生物として用いるコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する微生物としては、いわゆるコリネ型グルタミン酸生産菌として知られる微生物は全て用いることができるが、好適には下記の細菌が用いられる。

コリネバクテリウム・グルタミクム ATCC 31833

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム ATCC 13870

コリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC 13868

コリネバクテリウム・リリウム ATCC 15990

プレビバクテリウム・ディバリカツム ATCC 14020

プレビバクテリウム・フラブム ATCC 14067

プレビバクテリウム・イマリオフィラム ATCC 14068

プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC 13869

プレビバクテリウム・チオゲニタリス ATCC 19240

上記したようなコリネ型グルタミン酸生産菌の野生株のほか、オレイン酸などに対する要求性やリゾチーム感受性、温度感受性、フロロピルビン酸感受性、さらには種々の物質に対する耐性などが付与された菌株も用いることができる。

本発明におけるPFKの合成に関与する遺伝子の供給源となる微生物としては、PFK活性を有する微生物ならばいかなる微生物でも使用できる。なかでも原核生物である細菌、たとえばエシェリヒア属、コリネバクテリウム属、プレビバクテリウム属またはバチルス属に属する菌株が好ましい。具体的に好適な例としてはエシェリヒア・コリ（大腸菌）があげられる。PFK遺伝子は、上記したような菌株の染色体DNAより得ることができる。

該DNAを組み込むためのベクターとしては、コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属菌種中で自律複製できるものであれば特に限定されないが、例えばpCG1（特開昭57-134500）、pCG2（特開昭58-35197）、pCG4、pCG11（いずれも特開昭57-183799）、pCE54、pCB101（いずれも特開昭58-105999）、pCE51（特開昭60-34197）、pCE52、pCE53（いずれもモレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス（Mol. Gen. Genet.）196 175 (1984)】、およびそれらから誘導されたプラスミドを使用することができる。

PFKをコードする遺伝子を含む供与体DNAとベクターDNAとの組換え体DNAは、試験管内で両DNAを制限酵素で切断した後、DNAリガーゼで処理するか、またはその切断末端をターミナルトランスフェラーゼやDNAポリメラーゼなどで処理した後、DNAリガーゼを作用させて結合する常法〔メソッジ・イン・エンチモロジイ（Methods in Enzymology）68, (1979)〕により種々の組換え体混成物とともに生成させることができる。この混成物を用いて、PFKをコードする遺伝子の欠失したコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属の変異株を形質転換し、欠損形質が相補された形質転換株を選択し、この形質転換株の有するプラスミドを単離することによって、PFKをコードする遺伝子を含む組換え体DNAを取得できる。コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属微生物の形質転換法としては、プロトプラストを用いる方法（特開昭57-186492および特開昭57-186489）により実施することができる。

PFKをコードする遺伝子を含む組換え体DNAとベクターDNAとの組換え体DNAは、試験管内で両DNAを制限酵素で切断した後、DNAリガーゼで処理するか、またはその切断末端をターミナルトランスフェラーゼやDNAポリメラーゼなどで処理した後、DNAリガーゼを作用させて結合する常法〔メソッジ・イン・エンチモロジイ（Methods in Enzymology）68, (1979)〕により種々の組換え体混成物とともに生成させることができる。この混成物を用いて、PFKをコードする遺伝子の欠失したコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属の変異株を形質転換し、欠損形質が相補された形質転換株を選択し、この形質転換株の有するプラスミドを単離することによって、PFKをコードする遺伝子を含む組換え体DNAを取得できる。コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属微生物の形質転換法としては、プロトプラストを用いる方法（特開昭57-186492および特開昭57-186489）により実施することができる。

コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属菌株で直接組換え体DNAを選択する代わりに、例えば大腸菌のように既に遺伝子組換え技術が確立している宿主ベクター系を用いることもできる。すなわち、供与体DNAとベクターDNAの試験管内結合反応物を用い、マンニトール非資化性株として取得される大腸菌のPFK欠損変異株を形質転換し、マンニトール資化性の回復した形質転換株を選択する。この形質転換株からクローニングしたDNAとコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属微生物のベクターDNAを取り出し、これを試験管内で制限酵素で切断した後、DNAリガーゼで再結合反応させる。この反応物を用いてPFKをコードする遺伝子の欠損したコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属の変異株を形質転換し、欠損形質が相補された形質転換株を選択する。この手段によっても同様に目的の組換え体DNAを取得できる。

また、大腸菌とコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属菌種において複製可能なシャトルベクターを用いれば、PFKが欠損した大腸菌の変異株を用いて、上記のようにしてPFK遺伝子をクローニングすることで直接、目的の組換え体DNAを取得できる。

本発明で用いるPFKをコードする遺伝子の具体的に好適な例としては、大腸菌K12株のPFK遺伝子(*pfkA*)があげられる。該遺伝子は、大腸菌K12株のジーンバンク[セル(Cell), 9, 91 (1976)]中のプラスミドpLC16-4に含まれていることが知られている[ジーン(Gene), 1, 347 (1977)]が、さらに最近の詳細な解析の結果、プラスミドpLC16-4中の8.5キロベース(以下kbと略す)のPstI-DNA断片上に大腸菌のベクタープラスミドColE1の複製開始点とともに存在していることが示されている[ジャーナル・オブ・バクテリオロジイ(J. Bacteriol.), 152, 98 (1982)]。従ってこの8.5kbのPstI-DNA断片をコリネバクテリウム属およびプレビバクテリウム属菌種のベクター、例えばpCG11と結合させることにより、大腸菌K12株のPFK遺伝子を有し、大腸菌とコリネバクテリウム属およびプレビバクテリウム属菌種中で複製可能な組換え体DNAを作製することができる(第1図参照)。

PFK遺伝子を含む組換え体DNAを保有する形質転換株によるL-グルタミン酸の生産は、従来知られているように培地中のビオチン含量を低く抑えて培養するか、ビオチン含量の高い培地の場合にはペニシリンのような抗生物質(特公昭37-1695)や界面活性剤(特公昭40-8798、特公昭40-14559)などを加えて培養することにより行なわれる。またオレチン酸要求性やグリセロール要求性などの栄養要求性が付与された変異株を宿主とした形質転換株では、これら要求物質の量を制限して培養することで(特公昭53-6233、特公昭53-28519)、温度感受性変異株を宿主とした形質転換株では培養中途に培養温度を高めることで(特公昭58-32595) L-グルタミン

酸の生産が行なわれる。

培地中の炭素源としてはグルコース、グリセロール、フランクトース、シュークロース、マルトース、マンノース、澱粉、澱粉加水分解物、糖蜜などの種々の炭水化物、ポリアルコール、ビルビン酸、スマール酸、乳酸、酢酸などの各種有機酸が使用できる。さらに菌の資化性によって、炭化水素、アルコール類なども用いられる。とくに廃糖蜜は好適に用いられる。

窒素源としてはアンモニアあるいは塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、酢酸アンモニウムなどの各種無機および有機アンモニウム塩類あるいは尿素および他の窒素含有物質ならびにペプトン、NZ-アミン、肉エキス、酵母エキス、コーン・スチーブ・リカーカゼイン加水分解物、フィッシュミールあるいはその消化物、脱脂大豆粕あるいはその消化物、蛹加水分解物などの窒素含有有機物など種々のものが使用可能である。

さらに無機物としては、リン酸第一水素カリウム、リン酸第二水素カリウム、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガンおよび炭酸カルシウムなどが使用できる。微生物の生育に必要なビタミン、アミノ酸源などは、前記したような他の培地成分に従って培地に供給されれば特に加えなくてもよい。

培養は振盪培養あるいは通気搅拌培養などの好気的条件下に行なう。培養温度は一般に20~40℃が好適である。培養中の培地のpHは中性付近に維持することが望ましい。培養期間は通常1~5日間で培地中にL-グルタミン酸が蓄積する。

培養終了後、菌体を除去して晶析、活性炭処理、イオン交換樹脂処理などの公知の方法で培養液からL-グルタミン酸を回収する。

本発明の有用性は、PFK遺伝子とコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属菌種のベクターDNAとを形質発現できる形で組み換えた組換え体DNAをコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属菌種に導入すれば、該菌種のL-グルタミン酸の生産性を強化できる点にある。本明細書では大腸菌のPFK遺伝子を用いる例を示したが、代わりに他第の微生物のPFK遺伝子を用いても目的が達成される。それゆえ、PFK遺伝子は本明細書で例示した大腸菌のPFK遺伝子に限定されるものではない。またベクタープラスミドは、組換えとして連結されたPFK遺伝子を安定に遺伝させるために、その自律複製能を提供しているにすぎない、従って、本明細書に例示したpCG11に限らず、コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属菌種中で自律複製できるプラスミドはすべて本願発明方法で使用される。

グルタミン酸高生産能を有するいわゆるコリネ型グルタミン酸生産菌は、主な菌学的性質を同じくしているにもかかわらず、産業上の重要性から、各研究者により、種

々の菌名が付されており、属名までも、コリネバクテリウム属あるいはプレビバクテリウム属など種々である。しかしながら、これらの菌群は、細胞壁のアミノ酸構成やDNAの塩基組成が画一的であることから、同一の菌種であることが指摘されていた。さらに、最近、これらの菌種間には、70~80%以上のDNAの相同性があることが明らかにされ、非常に近縁な微生物であることが明白である [Komatsu, Y.: レポート・オブ・ザ・ファーメンティティブ・リサーチ・インスティチュート (Report of the Fermentative Research Institute), No. 55, 1 (1980) および Suzuki, K., Kaneko, T. and Komagata, K.: インターナショナル・ジャーナル・オブ・システムティック・バクテリオロジイ (Int. J. Syst. Bacteriol.), 31, 131 (1981) 参照]。

本明細書では、コリネバクテリウム・グルタミクムATCC 31833、コリネバクテリウム・ハーキュリスATCC 13868およびプレビバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC 13869にPFK遺伝子を含む組換え体DNAを導入し、その遺伝子の形質発現に基づくL-グルタミン酸生産性の向上について例示したが、上記の事実を踏まえればコリネ型グルタミン酸生産菌全般での効果が容易に類推される。その効果の有無は組換え体DNAがコリネ型グルタミン酸生産菌全般で自律的に複製し、PFK遺伝子が形質発現できるか否かに係わり、コリネ型グルタミン酸生産菌間のDNA相同性などにおける若干の相違は何ら関係ない。

しかしに、これらの菌種がプラスミドの複製と遺伝子発現に係わる機能を等しく保持していることは、特開昭57-183799に開示されたコリネバクテリウム・グルタミクム225-250株から分離され、スペクチノマイシンおよび/またはストレプトマイシン耐性遺伝子を有するプラスミドpCG4がコリネバクテリウム属およびプレビバクテリウム属菌種などのコリネ型グルタミン酸生産菌内で同じく複製でき、またその耐性遺伝子が発現される (特開昭57-186492) ことから明らかである。従って、本発明のPFK遺伝子を含む組換え体DNAを導入することによるL-グルタミン酸生産菌の作製法を適用し得る菌種は、コリネバクテリウム・グルタミクムATCC 31833、コリネバクテリウム・ハーキュリスATCC 13868およびプレビバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC 13869に限らずコリネバクテリウム属およびプレビバクテリウム属を含むコリネ型グルタミン酸生産菌全てが含まれる。

以下に本発明の実施例を示す。

実施例

(1) pLC16-4とpCG11の試験管内組換え

pLC16-4は大腸菌K12株のジーンバンク [セル (Cell), 9, 91 (1976)] から得られ、その中の8.5kbのPst I DNA断片上に大腸菌のベクタープラスミドColE1の複製開始点とともに大腸菌K12株のPFK遺伝子 (pfkA) が含まれている [ジャーナル・オブ・バクテリオロジイ (J. Bacteriol.), 152, 98, (1982)] ことが知られている。プラ

10

20

30

40

50

スミドである。pCG11は特開昭57-183799に開示されたコリネバクテリウム属およびプレビバクテリウム属のベクタープラスミドで、ストレプトマイシンおよびスペクチノマイシン耐性遺伝子を有する。pLC16-4は、それを保有する大腸菌K12株亜株の培養菌体からアンラの方法 [ジャーナル・オブ・バクテリオロジイ (J. Bacteriol.), 140, 400 (1979)] に従い単離した。pCG11は、それを保有するコリネバクテリウム・グルタミクムLA103/pCG11 (ATCC 39022) の培養菌体から濃縮単離した。即ち該菌株を400mlのNB培地 (粉末ブイヨン20g、酵母エキス5gを水1ℓに含みpH7.2に調整した培地) で660nmにおける吸光度 (OD) (以下、特記しない限り吸光度は660nmで測定) が約0.8になるまで生育させた。培養液から菌体を集菌し、TES緩衝液 [トリス (ヒドロキシルメチル) アミノメタン (以下トリスと略す) 0.03M、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (以下EDTAと略す) 0.005M、MaCl0.05M、pH8.0] で洗浄後、リゾチーム溶液 (2.5%ショ糖、0.1M NaCl、0.05Mトリス、0.8mg/mlリゾチーム;pH8.0) 10mlに懸濁し、37℃で4時間反応させた。反応液に5M NaCl2.4ml、0.5M EDTA (pH8.0) 0.6ml、および4%ラウリル硫酸ナトリウムと0.7M MaClからなる溶液4.4mlを順次添加し、緩やかに混和してから氷水中に15時間置いた。溶解物全量を遠心管に移し、4℃で60分間、69,400×gの遠心分離にかけ上澄液を回収した。これに重量百分率10%相当のポリエチレングリコール (PEG) 6,000 (半井化学薬品社製) を加え、静かに混和して溶解後、氷水中に置いた。10時間後、1,500×gで10分間遠心分離してペレットを回収した。TES緩衝液5mlを加えてペレットを静かに再溶解してから1.5mg/mlエチジウムプロマイド2.0mlを添加し、これに塩化セシウムを加えて静かに溶解し、密度を1.580に合わせた。この溶液を18℃で105,000×g、48時間超遠心分離にかけた。この密度勾配遠心により共有結合で閉じられた環状のDNAは、紫外線照射することによって遠心チューブ中下方の密度の高いバンドとして見出された。このバンドを注射器で遠心チューブの側面から抜きとることによってプラスミドpCG11が分離された。ついで分離液を等容量のイソプロピルアルコール液 (容量百分率90%イソプロピルアルコール、10%TES緩衝液 (この混和中に飽和溶解量の塩化セシウムを含む)) で5回処理してエチジウムプロマイドを抽出除去し、かかる後にTES緩衝液に對して透析した。こうしてpCG11プラスミドDNAを得た。pLC16-4プラスミドDNA1μgを含む制限酵素PstI用反応緩衝液 [20mMトリス、10mM MgCl₂、50mM (NH₄)₂SO₄、0.01%ウシ血清アルブミン、pH7.5] μlに5単位のPstI (宝酒造社製、5単位/μg) を添加し、37℃で2時間消化反応させた。pCG11プラスミドDNA1μgについても同様にしてPstIによる消化反応を行った。両消化物を65℃で40分間加温した後混合し、T4リガーゼ緩衝液 (660mMトリス、66mM MgCl₂、100mMジチオスレイトー

ル、pH7.6) 11 μ l、100mM ATP 1 μ l、T4リガーゼ(宝酒造社製:350単位/ μ l) 100単位を加え、12°Cで24時間反応させた。得られたリガーゼ反応混合物を形質転換に供した。

(2) pEpfk-1の取得

形質転換は異種微生物より調製されたDNA断片の結合操作を頻度よく行うことができるよう、宿主特異的制限欠損変異(hsd R)を有する大腸菌K12株WA802(メチオニン要求性;FERM BP-718)を用いて行った。WA802株のコンピテント・セルはダジェルトらの方法[ジーン(Gene), 6, 23 (1979)]で調製した。

即ち、L培地(バクトリプトン10g、酵母エキス5g、グルコース1gおよびNaCl15gを水1 lに含み、pH7.2に調整した培地)50mlにWA802株を植菌し、ODが0.5になるまで37°Cで培養した。培養液を氷水中で10分間冷却してから遠心した。冷却した0.1M CaCl₂20mlに菌体を再懸濁し、0°Cに20分間置いた。菌体を再遠心し、0.1M CaCl₂0.5mlに懸濁し、0°Cで18時間置いた。CaCl₂処理した菌液150 μ lに前記(1)で得られたリガーゼ反応混合物5 μ lを添加混合し、0°Cに10分間置いてから37°Cで5分間加温した。次いでL培地2mlを添加し、37°Cで2時間振盪培養した。

生理食塩水で2回遠心洗浄後スペクチマイシン100 μ g/mlを含むL寒天培地(L培地1 lに寒天16gを含む培地)に塗布し、37°Cで2日間培養した。出現した形質転換株のうちの1株から、前記のpLC16-4を単離したのと同様の方法によりプラスミドDNAを単離した。該プラスミドDNAを用いてPFKが欠損した大腸菌K12株WA55DF456(メチオニン、アルギニン要求性およびマンニトール非資化性(PFK欠損変異);ジャーナル・オブ・バクテリオロジー(J. Bacteriol.), 137, 502 (1979)]を前記と同様に形質転換し、スペクチノマイシン耐性株を選択した。それらは全てマンニトール資化性を獲得しており、該プラスミドにPFK遺伝子が含まれていることが示された。また該プラスミドDNAを制限酵素消化とアガロースゲル電気泳動で解析した結果、第1図に示すように、PFK遺伝子と大腸菌のベクタープラスミドColE1の複製開始点とを含むpLC16-4中の8.5kbのPstI DNA断片[ジャーナル・オブ・バクテリオロジー(J. Bacteriol.) 152, 98 (1982)]がpCG11のPstI切断部位に挿入された構造を有していた。このプラスミドをpEpfk-1と命名した。

(3) pEpfk-1による形質転換

コリネバクテリウム・グルタミクムATCC 31833、コリネバクテリウム・ハーキュリスATCC13868およびプレビバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869のプロトプラストを形質転換してpEpfk-1を導入した。コリネバクテリウム・グルタミクムATCC31833、コリネバクテリウム・ハーキュリスATCC13868、およびプレビバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869をそれぞれNB培地にて30°Cで16時間振盪培養し、その異培養0.1mlを1

0mlのSSM培地[グルコース10g、NH₄Cl4g、尿素2g、酵母エキス1g、KH₂PO₄1g、K₂HPO₃3g、MgCl₂·6H₂O0.4g、FeS O₄·7H₂O10mg、MnSO₄·4~6H₂O0.2mg、ZnSO₄·7H₂O0.9mg、CuSO₄·5H₂O0.4mg、Na₂B₄O₇·10H₂O0.09mg、(NH₄)₂MoO₄·4H₂O0.04mg、ビオチン30 μ g、サイアミン塩酸塩1mgを純水1 lに含みpH7.2に調整した培地]の入ったL字型試験管に接種し、モノ型培養槽にて30°Cで振盪培養した。ODが0.15になった時点で0.5単位/mlになるようにペニシリンGを添加した。さらに培養を続け、ODが約0.6になったところで細胞を集菌し、PCGP培地[グルコース5g、カザミノ酸5g、酵母エキス2.5g、K₂HPO₄3.5g、KH₂PO₄1.5g、MgCl₂·6H₂O0.41g、FeSO₄·7H₂O10mg、MnSO₄·4~6H₂O2mg、ZnSO₄·7H₂O0.9mg、(NH₄)₂MoO₄·4H₂O0.04mg、ビオチン30 μ g、サイアミン塩酸塩2mg、コハク酸二ナトリウム135g、ポリビニルピロリドン(分子量10,000)30gを水1 lに含む培地]に1mg/mlのリゾチームを含む液(pH7.6)2mlに懸濁し、L型試験管に移して30°Cで5時間緩やかに振盪反応してプロトプラスト化した。このプロトプラスト菌液0.5ml

20を小試験管にとり、2,500×gで5分間遠心分離し、TSMC緩衝液[10mM MgCl₂、30ml CaCl₂、50mMトリス、400mMショ糖、pH7.5]1mlに懸濁して遠心洗浄後、TSMC緩衝液0.1mlに再懸濁した。この菌液に2倍濃度のTSMC緩衝液とpEpfk-1プラスミドDNA溶液との1対1混合液100 μ lを加えて混和し、次いでTSMC緩衝液中に20%PEG6,000を含む液1.0mlを添加して混合した。3分後2,500×gで5分間遠心分離にかけて上澄液を除去し、沈降したプロトプラストを1mlのRCGP培地(pH7.4)に懸濁してから30°Cで2時間緩やかに振盪した。ついでこのプロトプラスト懸濁液の0.3mlをスペクチノマイシン400 μ g/mlを含むRCGP寒天培地(RCGP培地に1.6%寒天を含む培地、pH7.4)に塗布し、30°Cで10日間培養した。

出現したスペクチノマイシン耐性形質転換株を400mlのSSM培地で振盪培養し、ODが0.15になったところで0.5単位/mlとなるようにペニシリンGを添加し、さらにODが0.65になるまで培養し、集菌した菌体から前記(1)のpCG11の単離法と同様な方法でプラスミドを単離した。これらのプラスミドを制限酵素消化とアガロースゲル電気泳動で解析した結果、各種制限酵素切断様式で特徴付けられるpEpfk-1同一の構造を有するものであることがわかった。

このような形質転換株がコリネバクテリウム・グルタミクムATCC 31833/pEpfk-1、コリネバクテリウム・ハーキュリスATCC13868/pEpfk-1およびプレビバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869/pEpfk-1である。このうち、コリネバクテリウム・グルタミクムATCC 31833/pEpfk-1は、コリネバクテリウム・グルタミクムK69(FERM BP-1160)として昭和61年8月29日付で工業技術院微生物工業技術研究所(微工研)に寄託されている。

(4) L-グルタミン酸生産試験

pEpfk-1による形質転換株のL-グルタミン酸生産試験を行った。

(a) 種培地は、グルコース4%、ポリペプトン2%、KH₂PO₄0.15%、K₂HPO₄0.05%、MgSO₄·7H₂O 0.05%、ビオチン10μg/ℓ、尿素0.3%、pH7.2の組成で120℃、10分間殺菌したものを用いる。この種培地にて

(3) で得られた形質転換株をそれぞれ30℃、24時間振盪培養した。種培養4mlをそれぞれ300ml容三角フラスコ中の生産培地（〔グルコース6%、(NH₄)₂SO₄0.2%、KH₂PO₄0.1%、K₂HPO₄0.05%、MgSO₄·7H₂O 0.05%、FeSO₄·7H₂O 2mg/ℓ、CuSO₄·5H₂O 1mg/ℓ、MnSO₄·4H₂O 10mg/ℓ、サイアミン塩酸塩1mg/ℓ、尿素0.5%、フェノールレッド10mg/ℓ、(pH6.5, 120℃, 20分殺菌)〕20mlに植菌して30℃で培養を行った。培養中、培養液をpH6.0～8.0に保つため、12時間目と20時間目の2回、10%尿素液を1mlずつ添加して30時間振盪培養した。

培養後、培養液をペーパークロマトグラフィーにかけ、ニンヒドリン発色後、比色定着してL-グルタミン酸の生産量を測定した。培養液中に蓄積したL-グルタミン酸生成量を第1表に示す。

第 1 表

菌株	L-グルタミン酸 (mg/ml)
コリネバクテリウム・グルタミクム ATCC 31833	28.8
コリネバクテリウム・グルタミクム ATCC 31833/pEpfk-1, (K69, FERM BP-1160)	32.6
コリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC 13868	25.6
コリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC 13868/pEpfk-1	28.5
プレビバクテリウム・ラクトファーム メンタムATCC 13869	27.0
プレビバクテリウム・ラクトファーム メンタムATCC 13869/pEpfk-1	31.2

(b) 発酵培地のグルコースの代わりに瓈糖蜜（グルコース換算）6%を用い、培養開始時にペニシリンG 5単位/mlを添加する以外は前記(a)と同様に培養を行い、L-グルタミン酸生成量を測定した。培養液中に*40

*蓄積したL-グルタミン酸生成量を第2表に示した。

第 2 表

菌株	L-グルタミン酸 (mg/ml)
コリネバクテリウム・グルタミクム ATCC 31833	27.6
コリネバクテリウム・グルタミクム ATCC 31833/pEpfk-1, (K69, FERM BP-1160)	31.2
コリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC 13868	24.0
コリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC 13868/pEpfk-1	27.6
プレビバクテリウム・ラクトファーム メンタムATCC 13869	24.6
プレビバクテリウム・ラクトファーム メンタムATCC 13869/pEpfk-1	28.8

発明の効果

本発明によれば、微生物のPFKの合成に関与する遺伝子を含む組換え体プラスミドDNAを保有させることによ

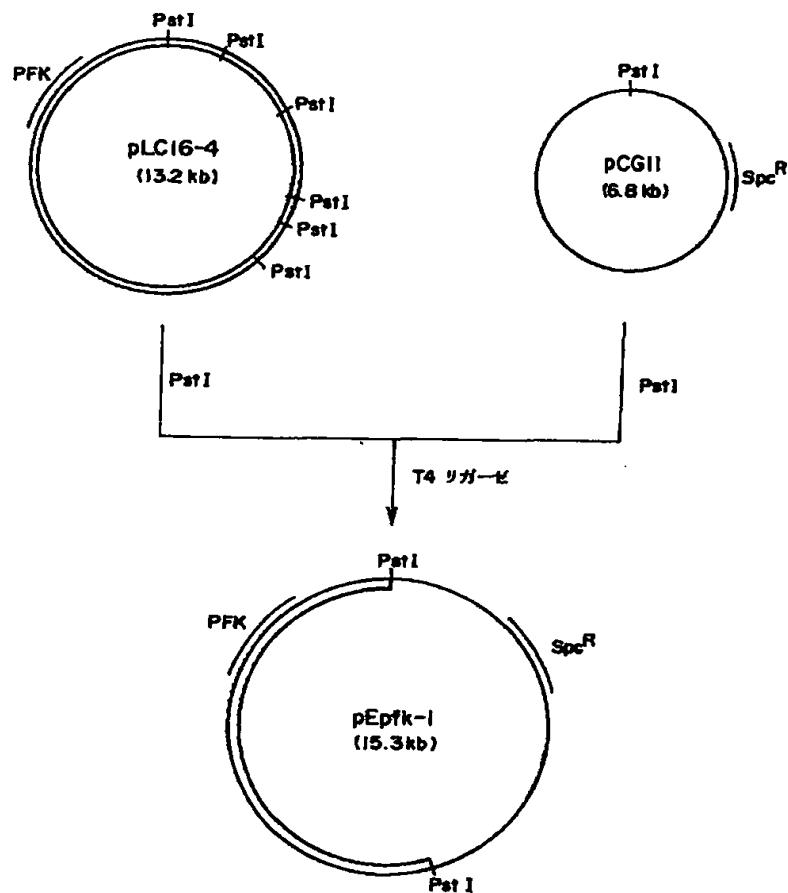
り、コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する微生物のL-グルタミン酸生産能を向上させることができる。

【図面の簡単な説明】

第1図はpEpfk-1の制限酵素PstIによる切断地図と作製工程を示す。

プラスミドの大きさはキロベース (kb) で表示されている。

【第1図】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

(C 12 P 13/14
C 12 R 1:13)

識別記号 庁内整理番号

F I

技術表示箇所